

(6) 101 60 651 3

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
30. November 2000 (30.11.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 00/71669 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: C12M 1/34  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03860  
(22) Internationales Anmeldedatum:  
28. April 2000 (28.04.2000)  
(25) Einreichungssprache: Deutsch  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch  
(30) Angaben zur Priorität:  
199 20 811.5 6. Mai 1999 (06.05.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): MICRONAS GMBH [DE/DE]; Hans-Bunte-Strasse  
19, D-79108 Freiburg (DE).  
(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEHMANN, Mirko  
[DE/DE]; Tennenbacher Strasse 50a, D-79106 Freiburg  
(DE). BRISCHWEIN, Martin [DE/DE]; Reutestrasse  
12, D-79100 Freiburg (DE). BAUMANN, Werner  
[DE/DE]; Riedbergstrasse 36, D-79100 Freiburg (DE).  
EHRET, Ralf [DE/DE]; Enggasse 19, D-79291 Merdingen  
(DE). FREUND, Ingo [DE/DE]; Obermühlenweg 1,

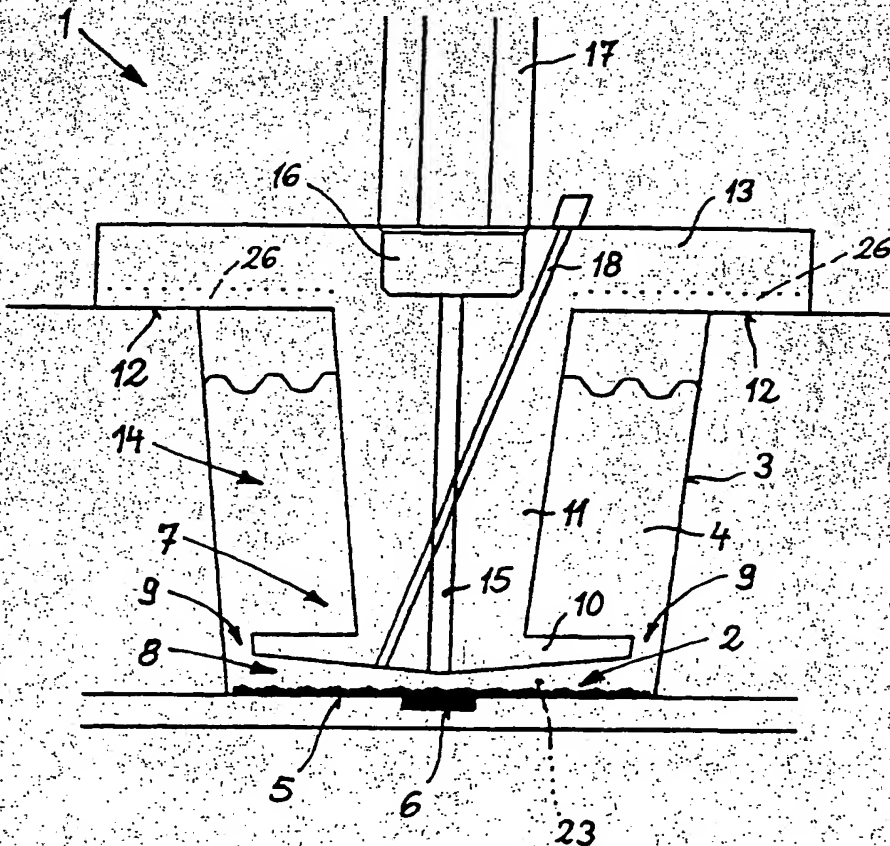
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title:

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUR DURCHFÜHRUNG VON UNTERSUCHUNGEN AN ZELLKULTUREN

(57) Abstract:

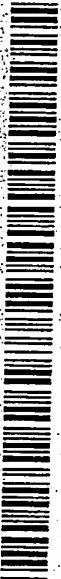
(57) Zusammenfassung:  
Eine Vorrichtung (1) dient zur Durchführung von Untersuchungen an Zellkulturen (2), die sich in einem flüssigen Kulturmedium (4) befinden. Die Vorrichtung weist wenigstens ein Aufnahmebehältnis (3) zur Aufnahme des Kulturmediums mit der Zellkultur auf, wobei ein oder mehrere Sensoren (6) für Messungen an der Zellkultur vorgesehen sind und wobei das Aufnahmebehältnis (3) wenigstens einen Zugang zum Zuführen und Abführen von flüssigem Kulturmedium (4) und dergleichen aufweist. Ein Trennkörper (7) ist in das oben offene Behältnis einführbar und innerhalb des Aufnahmebehältnisses in eine bodennahe Position bringbar, in der er einen gegenüber dem Gesamtaufnahmevermögen des Aufnahmebehältnisses kleinvolumigen Teilraum (8) des Aufnahmebehältnisses begrenzt. Weiterhin ist wenigstens ein Strömungskanal (9) vorgesehen, der einerseits



an den kleinvolumigen Teilraum (8) und andererseits einen Reservoirraum (149)

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

BEST AVAILABLE COPY



WO 00/71669 A1



D-79235 Vogtsburg-Oberrotweil (DE), WOLF, Bernhard  
[DE/DE]; Andreasstrasse 12, D-79252 Stegen (DE).

(74) Anwälte: SCHMITT, Hans usw.; Dreikönigstrasse 13,  
D-79102 Freiburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE).

**Veröffentlicht:**

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

## Vorrichtung zur Durchführung von Untersuchungen an Zellkulturen

Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung zur Durchführung  
5 von Untersuchungen an Zellkulturen, die sich in einem flüssigen  
Kulturmedium befinden, wobei die Vorrichtung wenigstens eine  
Aufnahme für Kulturmedium und die Zellkultur aufweist und wobei  
ein oder mehrere Meßeinrichtungen und/oder Sensoren für Messungen  
an der Zellkultur vorgesehen sind.

10 Bei einer solchen, bekannten Vorrichtung wird den Zellen in einer  
bestimmten zeitlichen Abfolge frisches Kulturmedium oder ein in  
diesem Kulturmedium gelöster Wirkstoff zugeführt beziehungsweise  
verbrauchtes Medium aus dem Zellkulturbereich entfernt. Eine  
15 häufige Regeneration des Kulturmediums, beispielsweise durch ein  
geeignetes Fluidiksystem, erzeugt ein weitgehend konstantes  
physiologisches Milieu. Leicht zersetzliche Wirkstoffe, die dem  
Nährmedium zugesetzt sind, können ebenfalls leichter regeneriert  
werden. Das zugeführte Medium und der Zellkulturbereich selbst  
20 müssen vor Kontamination durch Mikroorganismen und vor übermäßiger  
Verdunstung geschützt sein. Dies sind wichtige Voraussetzungen  
für die sensitive Messung zellulärer Reaktionen.

Gemeinsam ist allen Zellkulturbereichen eine Fläche am Boden für  
25 die Zellaufbewahrung/Zellwachstum sowie eine Wandung, die einen  
Trog für die Aufnahme des Kulturmediums bildet. Das Kulturmedium  
muß in regelmäßigen Zeitabständen regeneriert werden, da sich  
Abfallprodukte des Zellstoffwechsels akkumulieren, Nährstoffe  
verbraucht werden und biologisch aktive Substanzen ihre Aktivität  
30 im Laufe der Zeit einbüßen.

Aus der EP 0 394 406 ist bereits eine Vorrichtung für das Fluid-  
Handling von Zellkulturen in Kombination mit Sensoren bekannt.  
Diese Vorrichtung weist eine dicht abgeschlossene, kleinvolumige

Perfusionskammer auf, in der die Zellen kultiviert werden und die gleichzeitig mit einem Sensor bestückt ist. Die Kammer besitzt einen Zu- und einen Abflußkanal. Angetrieben von einer Flüssigkeitspumpe, fließt das Kulturmedium durch die Perfusionskammer. In periodisch aufeinanderfolgenden Intervallen folgen Phasen mit Perfusion und Phasen ohne Perfusion aufeinander. Die Phasen mit Perfusion dienen der Regeneration des Kulturmediums, die Phasen ohne Perfusion dem Meßvorgang, d.h. der direkten Verfolgung der extra-zellulären Ansäuerung in der Perfusionskammer.

Nachteilig ist jedoch, daß ein hoher apparativer Aufwand vorhanden ist, da eine Flüssigkeits-Antriebspumpe, Ventile zur Steuerung der Flüssigkeitsströme sowie Schlauchführungen nötig sind. Nachteilig ist weiterhin, daß eine gewisse Anfälligkeit für die Bildung von Luftblasen in der Perfusionskammer vorhanden ist, die nur unter vergleichsweise hohem Aufwand auszuschließen sind. Dazu sind Anlagen zur Teil-Entgasung des Mediums erforderlich, die den Zellkulturen vorgeschaltet werden müssen. Dies erhöht insgesamt den Aufwand. Schließlich ist ein relativ hoher Arbeitsaufwand erforderlich, um eine luftblasenfreie und luft- bzw. flüssigkeitsdichte Montage des Systems zu erzielen. Besonders nachteilig wirkt sich dies aus, wenn eine Vielzahl paralleler Proben zu testen sind, was in der Praxis die Regel ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Schaffung einer vergleichsweise einfachen Anordnung zur Regeneration von Zellkulturlösungen und die Schaffung kleiner Meßvolumina. Dabei soll auch die Möglichkeit gegeben sein, die geometrischen Umgebungsbedingungen der Zellkultur anpassen zu können.

Zur Lösung dieser Aufgabe wird vorgeschlagen, daß ein Trennkörper vorgesehen ist, welcher der auf der einen Boden aufweisenden Aufnahme befindlichen Zellkultur zum Verdrängen eines Teilvolumens des die Zellkultur überdeckenden, flüssigen Kulturmediums

annäherbar und in dieser Position oberseitig des Kulturmediums einen Reaktionsraum begrenzt.

Zweckmäßigerweise sind dabei ein oder mehrere Sensoren und/oder Meßeinrichtungen im Bereich dieses Reaktionsraums angeordnet.

5 Weiterhin kann nach einer bevorzugten Ausführungsform der Trennkörper zwischen einer bodennahen Position und einer bodenfernen Position hin-und herbewegbar sein und in der bodennahen Position den Reaktionsraum begrenzen.

10 In der bodennahen Position bildet der Trennkörper eine Abgrenzung eines kleinvolumigen Reaktionsraums, die zur Diffusionseinschränkung für Substanzen dient, die von den Zellen gebildet oder verbraucht werden.

15 Mit dieser erfindungsgemäßen Maßnahme ist ein kleinvolumiger Reaktionsraum realisierbar, in dem die durch den Zellstoffwechsel bedingten, meßbaren stofflichen Änderungen viel rascher vonstattengehen, als in einem großen Volumen. Aus der Änderungsgeschwindigkeit des pH-Wertes oder des Sauerstoff-Partialdruckes in einem Zeitintervall lassen sich beispielsweise Informationen über die Aktivität des Zellstoffwechsels gewinnen.

20 Eine Ausführungsform der Erfindung sieht vor, daß voneinander getrennte Kulturbereiche insbesondere durch strukturiert aufgebrachte, zellabweisende Beschichtungen oder durch eine dreidimensionale Strukturierung des Bodens mit Vertiefungen beziehungsweise Erhöhungen in den dazwischen befindlichen Trennbereichen gebildet sind und daß in den Kulturbereichen das Kulturmedium vorzugsweise jeweils als Tropfen vorliegt.

30 Mit dem zum Beispiel stempelartigen, eine unterseitige Flachseite aufweisenden Trennkörper kann der Tropfen von oben beaufschlagt und ein Teilvolumen seitlich verdrängt werden, bis unterhalb des Trennkörpers nur ein dünner, die Zellkultur überdeckender Flüssigkeitsfilm verbleibt, der den Reaktionsraum mit einem Mikroreaktionsvolumen an Kulturmedium bildet.



Der Trennkörper trennt in bodennaher Position den Reaktionsraum von dem übrigen, seitlich nach außen verdrängten Tropfenvolumen des Kulturmediums ab. Durch eine Hubbewegung des Trennkörpers kann dieses seitlich verdrängte, als Reservoir dienende Tropfenvolumen mit dem im Reaktionsraum befindlichen Kulturmedium-

5 Tropfenvolumen vermischt und dadurch eine Regeneration des im Reaktionsraum befindlichen Kulturmediums erreicht werden.

Eine Ausgestaltung sieht vor, daß wenigstens ein Trennkörper zu einer oder mehreren, auf dem Boden der Aufnahme befindlichen Zellkultur(en) jeweils seitlich zum Verdrängen eines Teilvolumens des die Zellkultur überdeckenden, flüssigen Kulturmediums positionierbar und dort gegebenenfalls annäherbar ist.

10

Beispielsweise können auf einem Halbleiterwafer mit Sensoren im Bereich dieser Sensoren Zellkulturen aufgebracht werden, bei denen dann ein Trennkörper nacheinander seitlich so positioniert werden kann, daß er sich oberhalb einer Zellkultur befindet. In dieser Position können dann Messungen durchgeführt werden. Es können dabei auch mehrere, seitlich in etwa horizontaler und gegebenenfalls auch etwa vertikaler Richtung positionierbare Trennkörper

15

20 vorgesehen sein.

Es können hierbei die Zellkultur(en) auf den Halbleiterwafer aufgebracht werden, um die Sensoren nach der Herstellung des Wafers zu testen oder aber der Halbleiterwafer mit den Sensoren bildet im wesentlichen die Testvorrichtung, um Messungen an Zellkulturen vornehmen zu können.

25

Der mit Zellkulturen besetzte Bereich des Halbleiterwafers kann bedarfsweise mit einer Umgrenzung zur Bildung eines Behältnisses für Zellkulturmedium umgrenzt sein.

Eine Ausführungsform der Erfindung, für die selbständiger Schutz beansprucht wird, sieht vor, daß als Aufnahme ein oben offenes Behältnis vorgesehen ist, in den ein Trennkörper ragt, der den Gesamtaufnahmeraum des Aufnahmebehältnisses in zwei übereinanderliegende Teilräume aufteilt, daß der bodenseitige Teilraum

30

einen gegenüber dem Gesamtaufnahmevermögen des Aufnahmebehältnisses  
kleinvolumigen Reaktionsraum und der andere Teilraum einen  
Reservoirraum bildet, daß wenigstens ein Strömungskanal vorgesehen  
ist, der einerseits an den Reaktionsraum und andererseits an den  
5 Reservoirraum angeschlossen ist, daß innerhalb des Trennkörpers  
ein oder mehrere Durchtrittskanäle vorgesehen sind, die in den  
kleinvolumigen Teilraum des Aufnahmebehältnisses und/oder den  
Reservoirraum des Aufnahmebehältnisses münden.

Zweckmäßigerweise sind auch hierbei ein oder mehrere Sensoren  
10 und/oder Meßeinrichtungen im Bereich des Reaktionsraumes  
angeordnet.

Auch bei dieser Ausführungsform können durch den kleinvolumigen  
Reaktionsraum zum Beispiel mikrosensorische Messungen bei erhöhter  
Zellkonzentration durchgeführt werden, wobei die erhöhte  
15 Zellkonzentration zu schnelleren Aktivitätsänderungen führt und  
damit zu einer Beschleunigung der entsprechenden Messung.

Der oberhalb des Reaktionsraums befindliche, durch den Trennkörper  
getrennte Reservoirraum kann bei dieser Ausführungsform vergleichs-  
weise groß sein, so daß verbrauchtes Medium im Reaktionsraum durch  
20 konvektive Vermischung mit Kulturmedium aus dem Reservoirraum  
über längere Zeiträume regenerierbar ist, ohne daß von außen  
Kulturmedium zugeführt werden muß.

Das konvektive Vermischen des im Reaktionsraum und im Reservoir-  
raum befindlichen Mediums kann erfolgen, indem über den  
25 Durchtrittskanäle ein bestimmtes Flüssigkeitsquantum an Kulturmedi-  
um dem Reaktionsraum zugeführt und wieder abgesaugt wird. Die  
konvektive Vermischung erfolgt über den Strömungskanal.

Nach einer Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, daß der  
Trennkörper innerhalb des Aufnahmebehältnisses zwischen einer  
30 bodennahen Position und einer bodenfernen Position hin- und  
herbewegbar ist.

Zum Regenerieren der Zellkulturlösung im Reaktionsraum besteht  
dadurch die Möglichkeit, den stempelförmigen Körper anzuheben  
und wieder in seine vorherige Position abzusenken. Dabei findet

eine konvektive Vermischung des verbrauchten Mediums aus dem Reaktionsraum und dem restlichen, im Reservoirraum befindlichen Medium des Zellkulturbehältnisses über den Strömungskanal statt. Das Abgeben und Ansaugen eines Flüssigkeitsquantums in Bezug auf das Mikroreaktionsvolumen erfolgt somit durch eine mechanische Bewegung des Trennkörpers nach oben und unten. Ein Komplettaustausch des Zellkulturmediums wird in Abhängigkeit von der Stoffwechselaktivität der Zellen und dem Gesamtvolumen der Meßlösung erst in größeren Zeitabständen fällig.

Der Trennkörper bildet einen oberen Abschluß des Reaktionsraum, so daß ein Schutz vor Verdunstung und auch Kontamination gegeben ist. Im übrigen wird das darin befindliche Mikroreaktionsvolumen auch durch das wesentlich größere Volumen von Kulturmedium im Reservoirraum gepuffert, so daß auftretende Verdunstungen an der Flüssigkeitsoberfläche insgesamt keine Auswirkungen haben auf das Mikroreaktionsvolumen.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung sieht vor, daß der Abstand des Trennkörpers von der Zellkultur und damit die bodennahe Position des Trennkörpers innerhalb des Aufnahmebehältnisses einstellbar ist. Durch den in seinem Abstand zum Boden des Aufnahmebehältnisses einstellbaren Trennkörper kann in der Umgebung der Zellkultur ein den jeweiligen Anforderungen exakt angepasstes Mikroreaktionsvolumen eingestellt werden. Dieses Mikroreaktionsvolumen kann dabei so eingestellt werden, daß nur ein schmaler Flüssigkeitssaum von z.B. 50 µm bis 500 µm über der Zellkultur verbleibt. Dadurch wird das geforderte Mikroreaktionsvolumen mit entsprechend hoher Zellkonzentration hergestellt.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung sieht vor, daß die Unterseite des Trennkörpers eine Gasblasen nach außen ableitende Profilierung, vorzugsweise eine konvexe Wölbung aufweist. Luft-



bzw. Gasblasen können somit entweichen und beeinträchtigen die Zellkultur beziehungsweise die Messung durch die Sensoren nicht. Der Trennkörper bildet dabei keinen luft- und flüssigkeitsdichten Abschluß des Zellkulturbereiches, so daß die Gasblasen nach außen entweichen können. Dadurch ist auch die Montage erleichtert, weil dazu nicht auf Gasfreiheit geachtet werden muß.

Besonders vorteilhaft ist es, wenn eine Vielzahl von Aufnahmebehältnissen vorzugsweise als Teil eines Pipettierautomaten vorgesehen sind, daß diese Aufnahmebehältnisse insbesondere durch handelsübliche Multiwell-Platten gebildet sind und daß am unteren Ende der Pipetten oder Dispenser-Kanäle des Pipettierautomaten jeweils die Trennkörper vorgesehen sind. Dadurch bilden diese Trennkörper eine Sonderform einer Pipettenspitze.

Gerade im Zusammenhang mit einem Pipettierautomaten und einer entsprechenden Vielzahl von zum Beispiel 96 Aufnahmebehältnissen als Zellkulturgefäße, wirkt sich der einfache Aufbau der jeweiligen Vorrichtung mit dem stempelförmigen Körper vorteilhaft aus. Insbesondere können zum Beispiel mikrosensorische Messungen in solchen Standard-Zellkulturformationen durchgeführt werden, was bei bekannten Systemen mit pumpengetriebenen Durchfluß praktisch nicht möglich ist.

Nach einer Weiterbildung der Erfindung ist vorgesehen, daß beabstandet zum Behälter-Boden und zwischen diesem und dem in der bodennahen Position befindlichen, Trennkörper eine flüssigkeitsdurchlässige Membrane oder dergleichen Filter oder Schutzabdeckung für die Zellkultur vorgesehen ist.

Durch die Integration einer solchen Membran, die als mikroporöses Membranfilter ausgebildet sein kann oder einer anderen Schutzeinrichtung unmittelbar oberhalb der Zellkultur, wird die empfindliche Zellkultur vor Flüssigkeits-Scherkräften und Druckstößen, die beim konvektiven Vermischen und dem Zuführen und Absaugen

von Zellkulturmedium auftreten können, bewahrt. Auch können dann Messungen an nicht-adhärenenten Zelltypen durchgeführt werden, die ansonsten leicht von den Flüssigkeitsströmen weg von den Sensoren oder aus dem kleinvolumigen Teilraum gespült werden könnten.

5 Nach einer Ausgestaltung der Erfindung kann die Auflagefläche für die Zellkultur optisch transparent sein. Damit können dann Messungen zum Beispiel der Absorption, Streuung, Fluoreszenz von den Zellen, gegebenenfalls nach einer Anfärbung, durchgeführt  
10 werden.

Zusätzliche Ausgestaltungen der Erfindung sind in den weiteren Unteransprüchen aufgeführt. Nachstehend ist die Erfindung mit ihren wesentlichen Einzelheiten anhand der Zeichnungen noch näher  
15 erläutert.

Es zeigt, etwas schematisiert:

Fig. 1

eine Vorrichtung für Untersuchungen an Zellkulturen mit einem Aufnahmebehälter, einer darin befindlichen Zellkultur sowie flüssigem Kulturmedium und einem in dieses eintauchenden Trennkörper,

Fig. 2 bis 4

die in Fig. 1 gezeigte Vorrichtung in unterschiedlichen Betriebssituationen,

Fig. 5 bis 7

die in Fig. 1 gezeigte Vorrichtung mit in unterschiedlichen Positionen befindlichen Trennkörper,

Fig. 8

eine schematische Darstellung eines Pipettierautomaten,

Fig. 9 eine Vielzahl von Aufnahmebehältnissen in Form einer Multititerplatte mit Mikrosensorarrays,

Fig. 10 und 11 auf einem Aufnahmeboden befindliche Kulturmediumtropfen mit in unterschiedlichen Positionen befindlichen Trennkörpern.

Eine in Fig. 1 bis 7 gezeigte Vorrichtung 1 dient zur Untersuchung an Zellkulturen 2. Die Vorrichtung weist dazu ein vorzugsweise trogähnliches Aufnahmebehältnis 3 auf, in welchem sich bodenseitig die Zellkultur 2 in einem flüssigen Kulturmedium 4 befindet. Am Boden 5 des Aufnahmebehältnisses befinden sich ein oder mehrere Sensoren 6, mit denen Messungen an der Zellkultur 2 vorgenommen werden können. Bevorzugt ist ein Halbleiterchip mit insbesondere einer Vielzahl von Mikrosensoren vorgesehen, wobei auch der gesamte Boden als Sensor-Chip ausgebildet sein kann, wie dies gut in Fig. 9 erkennbar ist. Der Sensor-Chip kann verschiedene Sensor-Funktionen tragen, beispielsweise für die Ionenaktivität, die Sauerstoffaktivität, die Aktivität gelöster Metabolite, elektrische Impedanz, Temperatur und dergleichen.

Das Aufnahmebehältnis 3 ist oben offen und es ist dort ein Trennkörper 7 eingeführt, der in einer bodennahen Position, wie in Fig. 1 erkennbar, einen gegenüber dem Gesamtaufnahmevervolumen des Aufnahmebehältnisses kleinvolumigen Teilraum als Reaktionsraum 8 begrenzt. Der Trennkörper 7 hat einen etwa dem Querschnitt des Aufnahmebehältnisses angepassten Querschnitt und zwischen ihm und der Innenwand des Aufnahmebehältnisses ist ein Überströmspalt 9 als Strömungskanal gebildet. Bei einem Behälterdurchmesser von beispielsweise 5 mm oder 10 mm weist der Überströmspalt 9 eine leichte Weite von weniger als 1 mm auf.

Der Trennkörper 7 hat im Ausführungsbeispiel einen plattenförmigen Kopf 10, an den sich ein stiel förmiger Schaft 11 anschließt. Die

der Zellkultur zugewandte Seite des Trennkörpers beziehungsweise dessen Kopf 10 ist so dimensioniert, daß sie zumindest eine den für die Messung der durch die Zellen verbrauchten oder gebildeten Substanzen Fläche abdeckt beziehungsweise begrenzt und insbesondere eine etwa der Sensor-Oberfläche entsprechende Fläche aufweist.

Außerhalb des Aufnahmebehältnisses 3 ist der Schaft 11 mit einem den Behältnisrand 12 übergreifenden Deckel 13 verbunden, der insbesondere einen Anschlag bildet zur Begrenzung der Eintauchtiefe des Trennkörpers 7 ins Innere des Aufnahmebehältnisses 3. Die Auflageseite des Deckels 3 ist so ausgebildet, daß sich kein gasdichter Abschluß ergibt. Strichpunktiert sind entsprechende Profilierungen oder Kanäle 26 angedeutet. Am Behältnisrand 12 und/oder im Auflagebereich des Deckels 13 können Einstellmittel vorgesehen sein, durch die die bodennahe Position des Trennkörpers 7 innerhalb des Aufnahmebehältnisses einstellbar ist. Dementsprechend ist die Größe des Reaktionsraums variierbar. Insbesondere kann dadurch ein sehr kleines Mikroreaktionsvolumen eingestellt werden, wobei der Abstand der Unterseite des Kopfes 10 von der Zellkultur zum Beispiel 50 µm bis 500 µm betragen kann. Der oberhalb des Kopfes 10 befindliche Teilraum des Aufnahmebehältnisses 3 bildet einen Reservoirraum 14, in welchem sich ebenso wie in dem unteren, kleinvolumigen Reaktionsraum 8 flüssiges Kulturmedium 4 befindet. Das Aufnahmenvolumen des Reservoirraumes kann etwa 100 mal größer sein als das Aufnahmenvolumen des Reaktionsraums 8.

Innerhalb des Trennkörpers 7 ist ein in den Reaktionsraum 8 mündender Durchtrittskanal 15 vorgesehen, dessen anderes Ende im Bereich des Deckels 13 einen Anschluß 16 zum Verbinden mit einer Pipette 17 oder dergleichen aufweist. Über diesen Durchtrittskanal 15 kann frisches Kulturmedium zugeführt und verbrauchtes Medium abgesaugt werden. Zusätzlich zu dem in den Reaktionsraum 8 mündenden Durchtritts-

kanal 15 können auch in den Reservoirraum 14 mündende Durchtritts- oder Verbindungskanäle vorgesehen sein.

Mit 18 ist eine Elektrode oder ein Sensor bezeichnet, die beziehungsweise der durch den Trennkörper 7 hindurchgeführt ist und bei dem Teilraum 8 endet. Beispielsweise kann hier eine  
5 Bezugselektrode für eine pH- und  $pO_2$ -Messung eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung 1 wird bevorzugt in Verbindung mit einem Pipettierautomaten 19 eingesetzt, der schematisch in  
10 Fig. 8 gezeigt ist. Deutlich sind hier drei sogenannte Multiwell-Platten 20 mit einer Vielzahl von Aufnahmebehältnissen 3 erkennbar. Standardmäßig können solche Multiwell-Platten 6, 24, insbesondere aber auch 96 Aufnahmebehältnisse als Zellkulturgefäße aufweisen.

15 Ein Pipettenkopf 21 mit einer Anzahl von Dispenser-Kanälen 22 ist mit einer hier nicht näher dargestellten Positioniereinrichtung verbunden, mittels der der Pipettenkopf in einer Ebene in zwei Koordinatenrichtungen bewegbar und zusätzlich auch in  
20 der Höhe verstellbar ist. Die einzelnen Dispenser-Kanäle 22 sind mit ihren freien Enden jeweils mit einem Trennkörper 7 verbunden und so positionierbar, daß die Trennkörper 7 in einer oder mehreren Reihen gleichzeitig in die Aufnahmebehältnisse 3 der Multiwell-Platten 20 eingeführt werden können.

25 Mit Hilfe des Pipettierautomaten kann in vorgebbaren Zeitabständen Flüssigkeit aus den einzelnen Aufnahmebehältnissen 3 entnommen und in andere Gefäße überführt werden beziehungsweise es kann Flüssigkeit aus Gefäßen entnommen und den mit Zellkulturen  
30 versehenen Aufnahmebehältnissen zugegeben werden. Prinzipiell kann somit eine periodische Regeneration des Mikroreaktionsvolumens in dem kleinvolumigen Teilraum 8 und somit in der Umgebung der Sensoren 6 sowie der lebenden Zellkultur vorgenommen werden. Das Mikroreaktionsvolumen wird hierbei nicht durch eine



geschlossene Perfusionskammer und die Regeneration nicht durch das Hindurchfließenlassen einer Lösung wie beim Stand der Technik erzeugt, sondern durch die Ausbildung des Trennkörpers 7 in Verbindung mit den nachfolgenden Verfahrensschritten erreicht.

5 Dazu ist in den Fig. 2 bis 4 ein Betriebsmodus gezeigt, bei dem ein Durchmischen des flüssigen Zellkulturmediums durch periodische Abgabe und Aufnahme von Zellkulturmedium erfolgt.

10 Der andere Betriebsmodus ist anhand der Fig. 5 bis 7 wiedergegeben. Hier erfolgt das Durchmischen des Zellkulturmediums durch periodisches Absenken und Anheben des Trennkörpers 7.

15 In den Fig. 2 bis 7 ist der jeweils mit dem Anschluß 16 verbundene Dispenser-Kanal 22 der Einfachheit halber weggelassen. Über diesen erfolgt das Zugeben und Absaugen von Kulturmedium. Eine Pipette 17 beziehungsweise Dispenser-Kanäle 22 sind in den Fig. 1 beziehungsweise 8 erkennbar.

20 Bei dem Betriebsmodus gemäß Fig. 2 bis 4 wird der am unteren Ende eines Dispenser-Kanales 22 eines Pipettenkopfes 21 befindliche Trennkörper 7 in ein Aufnahmebehältnis 3 eingeführt und der Zellkultur 2 soweit angenähert, daß sein Kopf 10 oberseitig einen kleinvolumigen Reaktionsraum 8 begrenzt, wobei das Flüssigkeits-  
25 volumen beispielsweise wenige Mikroliter betragen kann. In dieser bodennahen Position des Trennkörpers 7 beziehungsweise seines Kopfes 10 kann dann zum Beispiel eine mikrosensorische Messung beispielsweise der Stoffwechselaktivität der Zellkultur 2 erfolgen. Dabei können aus der Änderungsgeschwindigkeit des pH-  
30 Wertes oder des Sauerstoff-Partialdruckes in diesem Meßintervall Informationen über die Aktivität des Zellstoffwechsels gewonnen werden.

In einem nächsten Zeitintervall erfolgt dann eine Regeneration des Kulturmediums innerhalb des im Reaktionsraum 8 befindlichen Mikroreaktionsvolumens. Über den Durchtrittskanal 15 wird dazu ein bestimmtes Flüssigkeitsquantum an Kulturmedium dem Reaktionsraum 8 zugeführt, wobei Kulturmedium von dem Reaktionsraum 8 gemäß den Pfeilen Pf1 in den Reservoirraum 14 verdrängt wird, wo eine konvektive Vermischung von frischem und verbrauchtem Medium stattfindet. Anschließend wird ein gleiches Flüssigkeitsquantum durch den Kanal 15 abgesaugt, so daß aus dem Reservoirraum 14 gemäß den Pfeilen Pf2 Kulturmedium aus dem Reservoirraum 14 in den Reaktionsraum 8 überströmt. Anschließend erfolgt dann in einem Ruheintervall (Fig. 4), wo keine Durchströmung vorhanden ist, eine nächste zum Beispiel mikrosensorische Messung. In diesem anhand der Fig. 2 bis 4 beschriebenen Betriebsmodus wird im wesentlichen nur das Mikroreaktionsvolumen periodisch ausgetauscht, nicht jedoch das Reservoirvolumen des Aufnahmebehältnisses 3. Durch das Zuführen und Absaugen von dem Flüssigkeitsquantum wird praktisch eine "Pumpwirkung" mit Durchmischen des in dem Reaktionsraum 8 und in dem Reservoirraum 14 befindlichen, flüssigen Zellkulturmediums erreicht.

In vorgebbaren Zeitabständen wird ein Flüssigkeitsquantum entnommen und dieses in ein Abfallgefäß überführt und anschließend wird frisches Medium aus einem Vorratsgefäß angesaugt und in das mit einer Zellkultur bestückte Aufnahmebehältnis 3 gefüllt.

Der Betriebsmodus gemäß Fig. 5 bis 7 sieht vor, daß der Trennkörper 7 durch eine vertikale Bewegung gemäß dem Doppelpfeil Pf3 in periodischen Zeitabständen nach oben und unten geführt wird. Befindet sich der Trennkörper 7 in der unteren Position (Fig. 5 und 7) ist das vorgesehene Mikroreaktionsvolumen innerhalb des Reaktionsraums 8 für die Messung vorhanden. Nach dem Meßintervall wird der Trennkörper 7 angehoben und durch diese Bewegung nach oben findet eine konvektive Vermischung des ursprünglich im Reaktionsraum 8 befindlichen, verbrauchten

Kulturmediums mit dem restlichen Kulturmedium des Reservoirraumes 14 und damit eine Homogenisierung des Zellkulturmediums statt. Dieser Prozeß wiederholt sich periodisch. Ein Komplettaustausch des Zellkulturmediums wird nur in jeder n-ten Periode fällig, abhängig von der Stoffwechselaktivität der Zellen und dem Volumen der Meßlösung.

Das Regenerieren des im Reaktionsraum 8 befindlichen Kulturmediums erfolgt in diesem Fall durch eine mechanische Bewegung des stempelförmigen Körpers und durch Vermischen mit unverbrauchtem Kulturmedium aus dem Reservoirraum 14.

In beiden Betriebsmodi steht durch das im Vergleich zum Reaktionsraum 8 große Reservoir-Volumen insgesamt eine vergleichsweise große Menge an Zellkulturmedium zur Verfügung, das durch konvektionelle Vermischung mit dem Zellkulturmedium aus dem Mikroreaktionsvolumen für eine vergleichsweise lange mögliche Verweildauer sorgt, bis schließlich ein Austausch des Kulturmediums erfolgen muß.

Durch die erfindungsgemäße Anordnung, die auf ein kontinuierliches oder intervallweises Hindurchfließenlassen von Zellkulturlösungen verzichtet, werden die damit verbundenen Probleme vermieden. Die Anordnung kann mit einfachen Mitteln so gestaltet werden, daß sie kompatibel zu weitverbreiteten Zellkulturformaten wie z.B. die 96 well-Multititerplatte ist sowie zu einer Installation in Zellkultur-Inkubatoren ist. Sie kann sinnvollerweise, wie bereits vorbeschrieben, mit einem Pipettierautomaten kombiniert werden, um eine nicht-manuelle Regeneration der Zellkulturösungen zu erreichen.

In den Fig. 1 bis 7 ist noch gut erkennbar, daß die Unterseite des Kopfes 10 des Trennkörpers 7 konvex gewölbt ist, um zu bewirken, daß Gasblasen seitlich nach außen abgeleitet und über den Überströmspalt 9 nach oben gelangen können. Da der Deckel 13 keinen dichtenden Abschluß des Aufnahmebehältnisses 3 bildet,

was durch die punktierten Kanäle 26 in Fig. 1 angedeutet ist, ist ein Gasaustausch zwischen Kulturmedium und der umgebenden Atmosphäre gewährleistet. Trotz dieses nicht gasdichten Abschlusses des Aufnahmebehältnisses 3 ist ein genügender Schutz vor Verdunstung der Zellkulturlösung vorhanden und es wird auch das Eindringen mikrobiologischer Kontaminationen verhindert. Die Kanäle 26 sind in ihrem Querschnitt entsprechend klein dimensioniert.

Der gesamte Trennkörper 7 mit Deckel 15 besteht vorzugsweise aus glattem, zellabweisenden, inerten und leicht sterilisierbarem Material.

Weiterhin ist in den Figuren 1 bis 7 erkennbar, daß beabstandet zum Behältnis-Boden und zwischen diesem und dem in der bodennaher Position befindlichen Trennkörper 7 eine mikroporöse Membrane 23 als Schutzabdeckung für die Zellkultur vorgesehen ist. Durch dieses mikroporöse Membranfilter wird die empfindliche Zellkultur vor Flüssigkeits-Scherkräften und Druckstößen, die beim konvektiven Vermischen und dem Zuführen und Absaugen von Zellkulturmedium auftreten können, geschützt. Insbesondere bei nicht-adhärenenten Zelltypen wird vermieden, daß diese nicht von den Flüssigkeitsströmen weggespült werden.

Fig. 9 zeigt eine Multiwellplatte 20 vor dem Zusammenfügen von einem Oberteil und einem Unterteil. In dem hier dargestellten Ausführungsbeispiel wird für die Aufnahmebehältnisse 3 von einer handelsüblichen Mikrotiterplatte der Bodenbereich abgetrennt, so daß sich durchgängige Röhrchen ergeben. Dieses Mikrotiterplatten-Oberteil wird dann auf eine Substratplatte 24 aufgesetzt und vorzugsweise durch Ultraschallschweißen dicht mit dieser verbunden. Die Substratplatte 24 mit den jeweiligen Sensoren bildet dann den Boden der Einzelbehältnisse 3. Die Sensoren oder Sensor-Arrays auf der Substratplatte 2 sind bei Verwendung einer Mikrotiterplatte in dem Abstand der einzelnen Röhrchen oder Einzelbehältnisse angeordnet.

Durch Verwendung eines Mikrotiterplatten-Oberteiles zur Bildung der Aufnahmebehältnisse 3 besteht die Möglichkeit, bisher im Zusammenhang mit handelsüblichen Mikrotiterplatten eingesetzte Apparaturen, beispielsweise den in Fig.8 gezeigten Pipettier-  
5 automaten beziehungsweise einen Beprobungsautomaten, einen Mikroplattenreader und dergleichen unverändert einsetzen zu können.

Die Sensoren 6 können durch Sensorarrays mit mehreren, unterschiedlichen Einzelsensoren gebildet sein. Auf der Substratplatte  
10 kann sich auch eine Steuer- und Auswerteeinrichtung oder Teile davon befinden.

Außer elektronischen Sensoren auf Halbleiterbasis können auch noch andere Sensoren, beispielsweise auf optischer Basis oder auf der Basis der Dickfilmtechnologie oder biologische Sensoren  
15 vorgesehen sein und vorzugsweise in Kombination mit den zuvor beschriebenen Sensoren eingesetzt werden.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, unterseitig bei der Halbleiter-Substratplatte 24 eine Heizschicht vorgesehen, mittels der eine Temperierung der Substratplatte möglich ist. Bei Zellkulturen  
20 können so auch bezüglich der Temperatur deren normale Lebensbedingungen geschaffen werden, so daß Untersuchungen über einen längeren Zeitraum möglich sind. Es besteht auch die Möglichkeit, anstatt einer durchgängigen Heizschicht partielle, voneinander getrennte Abschnitte von Heizschichten vorzusehen, um bedarfsweise  
25 unterschiedliche Temperaturen in bestimmten Bereichen erzeugen zu können. Zur thermostatischen Regelung der Heizung können an einer oder mehreren Stellen der Substratplatte Temperaturmeßsensoren vorgesehen sein. Solche Temperaturmeßsensoren können auch direkt bei den einzelnen Aufnahmebehältnissen zugeordneten  
30 Sensoren 6 integriert sein. Temperaturmeßsensoren im Bereich der Einzelbehältnisse können außer zur thermostatischen Regelung einer Heizung auch zum Erfassen der biologischen Aktivität der Zellen verwendet werden.



Die Fig. 10 und 11 zeigen eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung 1a, bei der eine plattenförmige Aufnahme 3a vorgesehen ist, die oberseitig die Sensoren 6 trägt. Im Bereich des oder der Sensoren 6 ist das flüssige Kulturmedium 4 als Tropfen 25 aufgebracht. Dieser Kulturmedium-Tropfen überdeckt auf den Sensoren 6 befindliche Zellen bzw. eine Zellkultur 2. Zur Bildung eines kleinvolumigen Reaktionsraumes 8a wird der in Fig. 10 oberseitig des Tropfens 15 angesetzte Trennkörper 7a in eine bodennahe Position gebracht, wie dies in Fig. 11 gezeigt ist. Beim Absenken des stempelförmigen Trennkörpers 7a wird der Tropfen 25 verformt und ein Teil seines Volumens seitlich nach außen verdrängt. Unterhalb des Trennkörpers 7a in dessen Projektionsverlängerung verbleibt dann zwischen der Zellkultur 2 und der im wesentlichen flachen Unterseite des Trennkörpers 7a eine dünne Flüssigkeitsschicht mit einem entsprechend geringen Volumen, das wesentlich geringer sein kann, als das seitlich verdrängte Volumen des Tropfens 25.

Es steht somit einerseits, wie anhand von den Ausführungsbeispielen gemäß Fig. 1 bis 7 beschrieben, ein kleinvolumiger Reaktionsraum 8a und durch das seitlich über die Trennkörperprojektion verdrängte Kulturmedium-Volumen ein Reservoir 14a zur Verfügung. Ist das Kulturmedium 4 in dem spaltförmigen Reaktionsraum 8a durch Reaktion der Zellen verbraucht, kann der Trennkörper 7a etwas angehoben werden, wodurch aus den seitlich verdrängten Tropfenbereichen Kulturmedium unterhalb des Trennkörpers 7a gelangt und sich mit dem verbrauchten Kulturmedium vermischt. Anschließend wird der Trennkörper 7a wieder abgesenkt, so daß wieder ein kleinvolumiger Reaktionsraum 8a gebildet ist, wobei sich dann in diesem Bereich regeneriertes Kulturmedium befindet. Es schließt sich dann wieder eine Meßphase an. Diese Anordnung kann vorzugsweise eingesetzt werden, um auf unzersägten (Chip)-Wafern Funktionstests an Sensoren durchzuführen.

Die plattenförmige Aufnahme 3a kann etwa wie die Substratplatte 24 gemäß Fig. 9 ausgebildet sein, wobei die einzelnen Sensor-

bereiche durch strukturiert aufgebrachte, zellabweisende Beschichtungen voneinander getrennt sein können. In diesem Fall bildet der Boden der Aufnahme einen Teil eines die Sensoren aufweisenden Wafers.

5 Erwähnt sei noch, daß die plattenförmige Aufnahme 3a (Fig. 10 und 11) bzw. der Boden 5 der Aufnahmebehälter 3 (vgl. Fig. 1 bis 7) optisch transparent sein kann, damit die Zellkultur bzw. das in diesem Bereich befindliche Kulturmedium für optische  
10 Meßeinrichtungen vorzugsweise von unten zugänglich ist.

/Ansprüche

## Ansprüche

1. Vorrichtung zur Durchführung von Untersuchungen an Zellkulturen, die sich in einem flüssigen Kulturmedium befinden, wobei die Vorrichtung wenigstens eine Aufnahme für Kulturmedium und die Zellkultur aufweist und wobei ein oder mehrere Meßeinrichtungen und/oder Sensoren für Messungen an der Zellkultur vorgesehen sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Trennkörper (7a) vorgesehen ist, welcher der auf dereinen Bodenaufweisenden Aufnahme befindlichen Zellkultur (2) zum Verdrängen eines Teilvolumens des die Zellkultur überdeckenden, flüssigen Kulturmediums (4) annäherbar und in dieser Position oberseitig des Kulturmediums (4) einen Reaktionsraum (8a) begrenzt.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Trennkörper (7a) zwischen einer bodennahen Position und einer bodenfernen Position hin- und herbewegbar ist und in der bodennahen Position den Reaktionsraum (8a) begrenzt.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein Trennkörper zu einer oder mehreren, auf dem Boden der Aufnahme befindlichen Zellkultur(en) (2) jeweils seitlich zum Verdrängen eines Teilvolumens des die Zellkultur überdeckenden, flüssigen Kulturmediums (4) positionierbar und dort gegebenenfalls annäherbar ist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der oder die Sensoren (6) am oder im Boden der Aufnahme (3a) angeordnet sind, daß voneinander getrennte Kulturbereiche insbesondere durch strukturiert aufgetragene, zellabweisende Beschichtungen oder durch eine dreidimensionale Strukturierung des Bodens mit Vertiefungen beziehungsweise Erhöhungen in den dazwischen befindlichen

Trennbereichen gebildet sind und daß in den Kulturbereichen das Kulturmedium (4) vorzugsweise jeweils als Tropfen (25) vorliegt.

- 5 5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Boden der Aufnahme durch wenigstens einen Teil eines zumindest die Sensoren (6) aufweisenden Wafers gebildet ist.
- 10 6. Vorrichtung nach Oberbegriff des Anspruches 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Aufnahme ein oben offenes Behältnis (3) vorgesehen ist, in den ein Trennkörper (7) ragt, der den Gesamtaufnahmeraum des Aufnahmebehältnisses (3) in zwei übereinanderliegende Teilräume aufteilt, daß der bodenseitige Teilraum einen gegenüber dem Gesamtaufnahmevervolumen des Aufnahmebehältnisses (3) kleinvolumigen Reaktionsraum (8) und der andere Teilraum einen Reservoirraum (14) bildet, daß wenigstens ein Strömungskanal (9) vorgesehen ist, der einerseits an den Reaktionsraum (8) und andererseits an den Reservoirraum (14) angeschlossen ist, daß innerhalb des Trennkörpers (7) ein oder mehrere Durchtrittskanäle (15) vorgesehen sind, die in den kleinvolumigen Reaktionsraum (8) des Aufnahmebehältnisses (3) und/oder den Reservoirraum (14) des Aufnahmebehältnisses münden.
- 20 7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Sensoren (6) und/oder Meßeinrichtungen im Bereich des Reaktionsraumes (8, 8a) angeordnet sind.
- 25 8. Vorrichtung nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Trennkörper (7) innerhalb des Aufnahmebehältnisses (3) zwischen einer bodennahen Position und einer bodenfernen Position hin- und herbewegbar ist.
- 30

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die dem Boden (5) zugewandte Seite des Trennkörpers (7) zumindest eine den für die Messung der durch die Zellen verbrauchten oder gebildeten Substanzen abdeckende beziehungsweise begrenzende Fläche, insbesondere eine der Sensor-Oberfläche entsprechende Fläche aufweist.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Trennkörper (7) von oben in das Aufnahmebehältnis (3) einführbar ist.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Abstand des Trennkörpers (7) von der Zellkultur (2) und damit die bodennahe Position des Trennkörpers (7) einstellbar ist.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Trennkörper (7) vorzugsweise stempelförmig ausgebildet ist und einen Kopf (10) mit etwa dem Querschnitt des Aufnahmebehältnisses (3) angepaßten Querschnitt hat, der das Aufnahmebehältnis (3) in den Reaktionsraum (8) und den Reservoirraum (14) aufteilt und daß sich an den Trennkörper-Kopf ein nach außen führender Schaft (11) anschließt, dessen Außenquerschnitt kleiner ist als der lichte Innenquerschnitt des Aufnahmebehältnisses und daß der Zwischenraum zwischen dem Schaft und der Innenwand des Aufnahmebehältnisses (3) den Reservoirraum (14) bildet.
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß innerhalb des Trennkörpers (7) ein oder mehrere einerseits in den Reaktionsraum (8) und andererseits in den Reservoirraum (14) mündende Strömungskanäle vorgesehen sind.



14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Strömungskanal durch einen zwischen dem Trennkörper (7) und der Innenwand des Aufnahmebehält-  
nisses (3) vorgesehen Ringspalt (9) oder eine Rand-  
profilierung gebildet ist und daß dieser Strömungskanal  
beziehungsweise Strömungskanäle bei einem höhenverstellbaren  
Trennkörper (7) zumindest im Hubbereich zwischen der  
bodennahen Position und der bodenfernen Position des  
Trennkörpers (7) vorhanden ist/sind.
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Unterseite des Trennkörpers (7) eine  
Gasblasen nach außen ableitende Profilierung, vorzugsweise  
eine konvexe Wölbung aufweist.
16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß eine Hubbegrenzung für den Trennkörper  
(7) vorgesehen ist und daß dazu ein in der bodennaher  
Position wirksamer, vorzugsweise am oberen Behälterranda-  
nliegender Anschlag am Trennkörper (7) vorgesehen ist.
17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß  
der am oberen Behälterranda- anliegende Anschlag am Trennkörper  
(7) durch einen den Behältnisrand übergreifenden Deckel (13)  
oder durch einen mit einem Konusabschnitt in einen Gegenkonus  
der Behälteröffnung eingreifenden Deckel gebildet ist.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Trennkörper (7) oberseitig eine  
insbesondere genormte Aufnahmeöffnung, vorzugsweise einen  
Aufnahmekonus zum Kuppeln mit einer Pipette, einer  
Pipettenspitze oder einen Dispenser-Kanal aufweist.

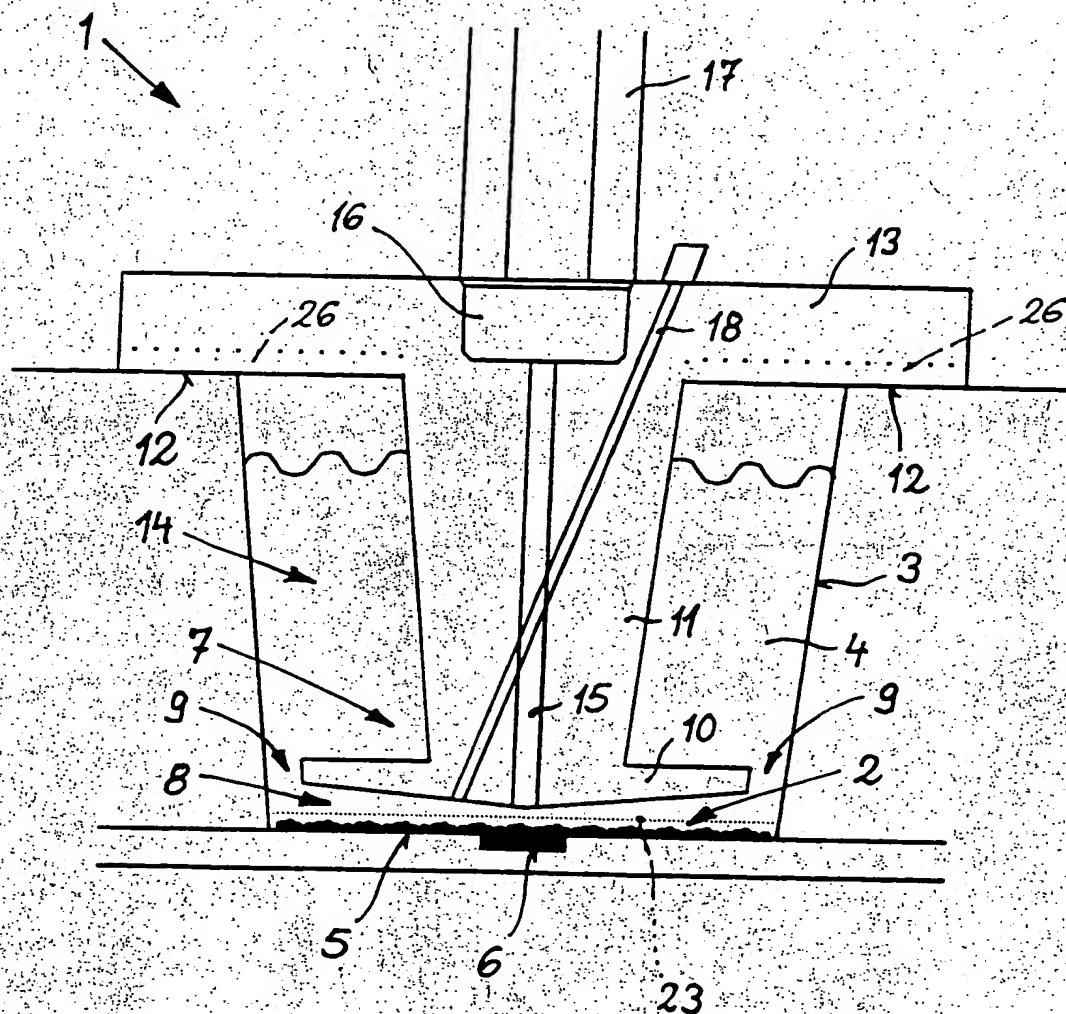
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das Aufnahmevolumen des Reservoirraums (14,14a) um ein Vielfaches größer ist als das Aufnahmevolumen des Reaktionsraums (8,8a) und daß diese beiden Volumina sich vorzugsweise etwa wie 10:1 bis etwa 100:1 verhalten.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest am Boden des Behältnisses (3) oder der Aufnahme wenigstens ein Chip mit einem oder vorzugsweise mehreren Mikrosensoren angeordnet ist.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß am Trennkörper (7), dem Reaktionsraum (8) und/oder dem Reservoirraum (14) zugewandt, Sensoren (6) und/oder Elektroden vorgesehen sind.
22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß beabstandet zum Behältnis-Boden und zwischen diesem und dem in der bodennahen Position befindlichen Trennkörper (7) eine mikroporöse Membrane (23) oder dergleichen Filter oder Schutzabdeckung für die Zellkultur (2) vorgesehen ist.
23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Trennkörper (7) aus glattem, zellabweisenden, inerten und leicht sterilisierbarem Material, vorzugsweise aus Polytetrafluoräthylen besteht.
24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Auflagefläche für die Zellkultur (2) optisch transparent ist und daß der Auflagefläche eine optische Meßeinrichtung zugeordnet ist, die vorzugsweise unterseitig angeordnet ist.

25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vielzahl von Aufnahmebehältnissen (3) vorgesehen sind, vorzugsweise als Teil eines Pipettierautomaten (19) vorgesehen sind, daß diese Aufnahmebehältnisse (3) insbesondere durch handelsübliche Multiwell-Platten (20) gebildet sind und daß an den unteren Enden der Dispenserkanäle des Pipettierautomaten jeweils die Trennkörper (7) vorgesehen sind.

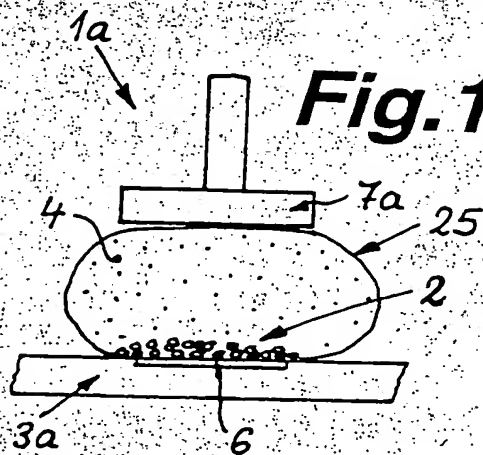
26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Trennkörper (7) an seiner dem Boden abgewandten Seite einen Anschluß zum Verbinden, insbesondere zum Aufstecken auf einen Dispenserkanal (22) vorzugsweise eines Pipettierautomaten aufweist.

/Zusammenfassung

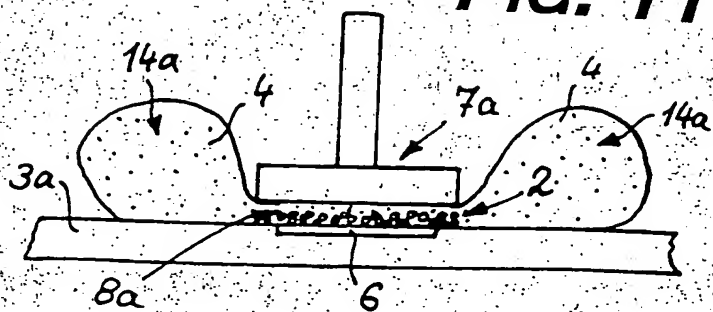
**Fig. 1**

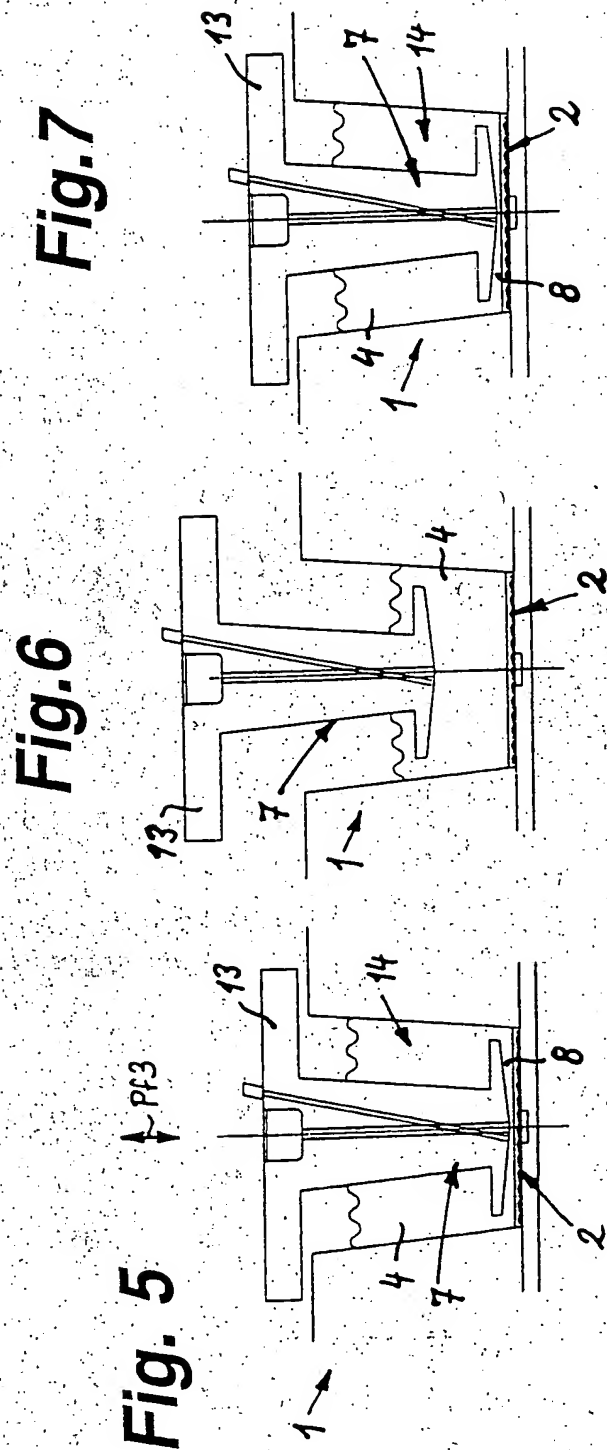
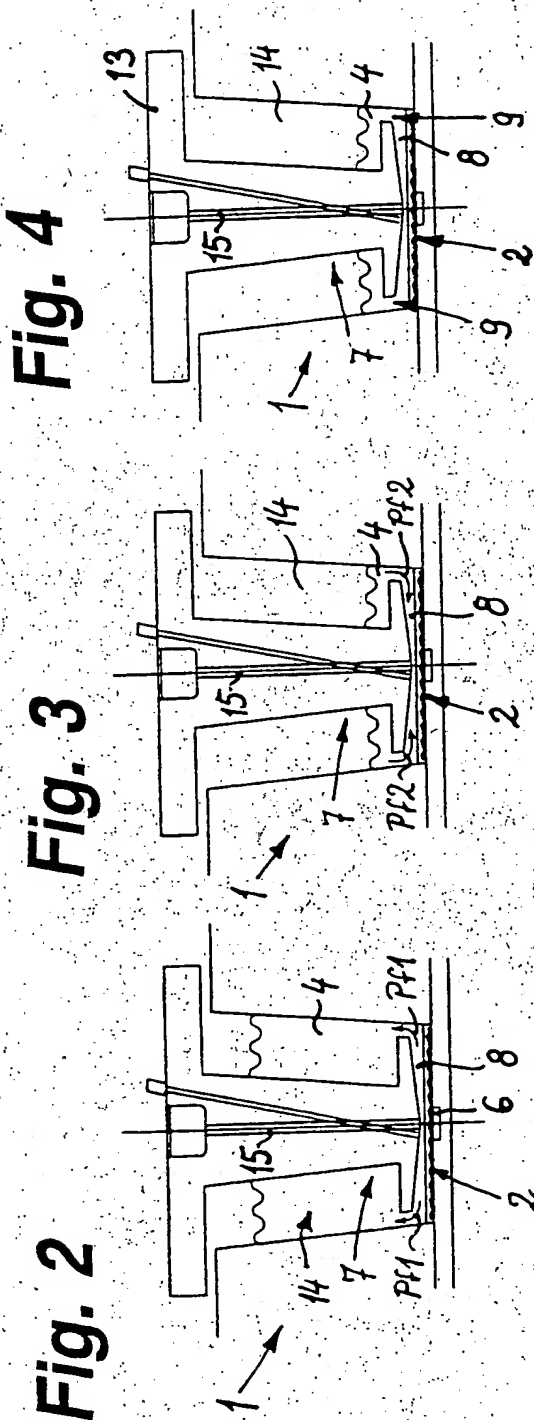


**Fig. 10**

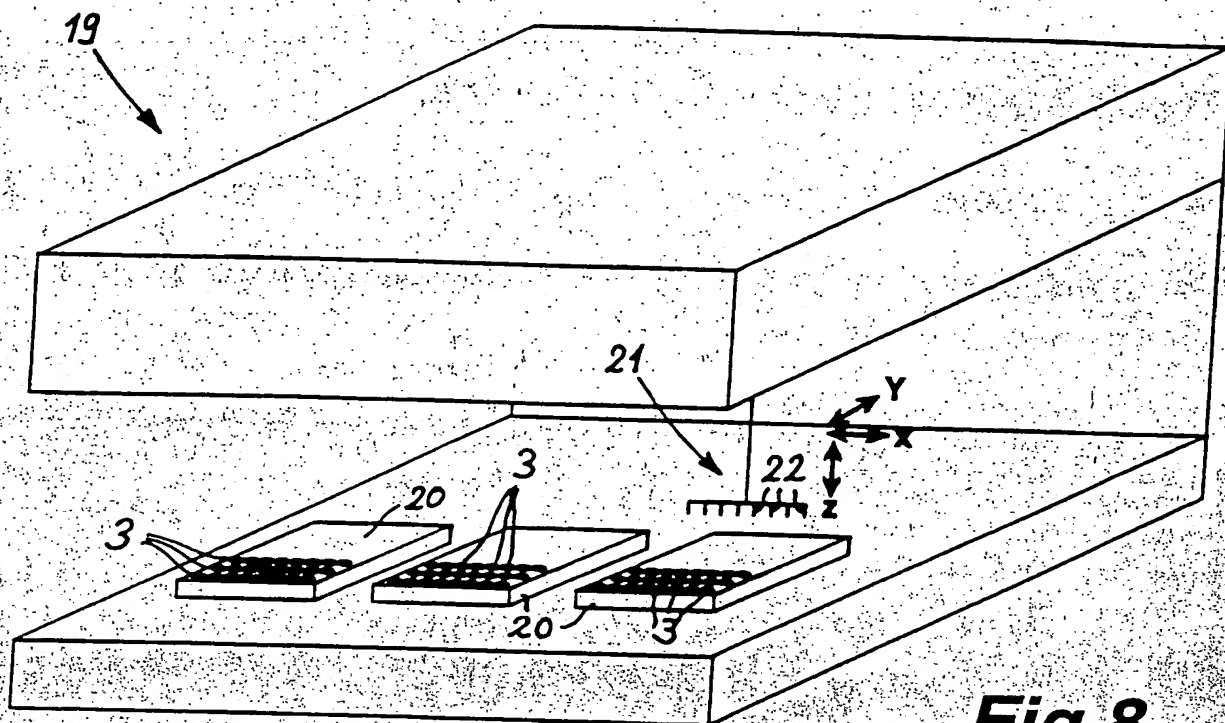


**FIG. 11**

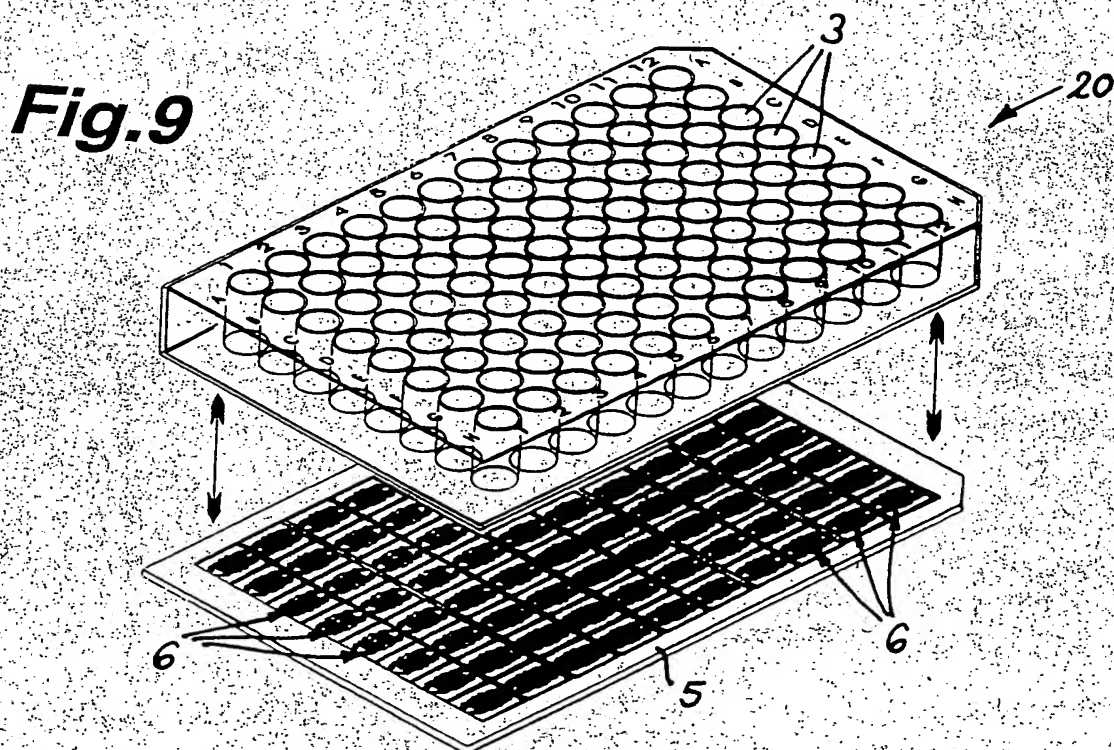








**Fig. 8**



**Fig. 9**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter: International Application No

PCT/EP 00/03860

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12M1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FR 2 690 926 A (LVMH RECH) 12 November 1993 (1993-11-12) claims; figures 1,3	1-3, 6-12,22
Y	WO 90 04645 A (MOLECULAR DEVICES CORP) 3 May 1990 (1990-05-03) cited in the application claims; figures	1-3, 6-12,22
Y	EP 0 608 153 A (BERTIN & CIE) 27 July 1994 (1994-07-27) claims; figure 1	1,2,6,8, 22
A	US 5 494 044 A (SUNDBERG KARIN) 27 February 1996 (1996-02-27)	
A	EP 0 818 540 A (IDEMITSU KOSAN CO) 14 January 1998 (1998-01-14)	
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

**\* Special categories of cited documents:**

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 September 2000

Date of mailing of the international search report

06/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Coucke, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/EP 00/03860

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category \*

Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Relevant to claim No.

A

US 4 125 436 A (LINER JOHN)  
14 November 1978 (1978-11-14)  
-----

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter-Application No

PCT/EP 00/03860

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2690926 A	12-11-1993	AU 4074193 A	29-11-1993
		CA 2135184 A	11-11-1993
		DE 69305163 D	07-11-1996
		DE 69305163 T	03-04-1997
		EP 0640124 A	01-03-1995
		ES 2093965 T	01-01-1997
		WO 9322420 A	11-11-1993
		JP 7506250 T	13-07-1995
		US 5707868 A	13-01-1998
WO 9004645 A	03-05-1990	AT 121790 T	15-05-1995
		CA 2001212 A	21-04-1990
		DE 68922390 D	01-06-1995
		DE 68922390 T	05-10-1995
		EP 0394406 A	31-10-1990
		JP 2993982 B	27-12-1999
		JP 3502642 T	20-06-1991
		US 5496697 A	05-03-1996
		US 5278048 A	11-01-1994
EP 0608153 A	27-07-1994	FR 2700553 A	22-07-1994
		AU 5835294 A	15-08-1994
		WO 9417174 A	04-08-1994
US 5494044 A	27-02-1996	AU 5568490 A	29-11-1990
		CA 2064193 A	11-11-1990
		DE 69018629 D	18-05-1995
		WO 9013261 A	15-11-1990
		DK 471721 T	26-06-1995
		EP 0471721 A	26-02-1992
		HK 35696 A	08-03-1996
		JP 5501965 T	15-04-1993
EP 0818540 A	14-01-1998	JP 8322594 A	10-12-1996
		JP 9065893 A	11-03-1997
		US 5897993 A	27-04-1999
		WO 9630542 A	03-10-1996
US 4125436 A	14-11-1978	NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03860

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12M1/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	FR 2 690 926 A (LVMH RECH) 12. November 1993 (1993-11-12) Ansprüche; Abbildungen 1,3	1-3, 6-12,22
Y	WO 90 04645 A (MOLECULAR DEVICES CORP) 3. Mai 1990 (1990-05-03) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche; Abbildungen	1-3, 6-12,22
Y	EP 0 608 153 A (BERTIN & CIE) 27. Juli 1994 (1994-07-27) Ansprüche; Abbildung 1	1,2,6,8, 22
A	US 5 494 044 A (SUNDBERG KARIN) 27. Februar 1996 (1996-02-27)	
A	EP 0 818 540 A (IDEMITSU KOSAN CO) 14. Januar 1998 (1998-01-14)	
	---	
	---	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung, nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. September 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06/10/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Coucke, A



# INTERNATIONALER **HERCHENBERICHT**

Inter: **Aktenzeichen**  
PCT/EP 00/03860

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 125 436 A (LINER JOHN) 14. November 1978 (1978-11-14) -----	



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/03860

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR 2690926 A	12-11-1993	AU 4074193 A CA 2135184 A DE 69305163 D DE 69305163 T EP 0640124 A ES 2093965 T WO 9322420 A JP 7506250 T US 5707868 A	29-11-1993 11-11-1993 07-11-1996 03-04-1997 01-03-1995 01-01-1997 11-11-1993 13-07-1995 13-01-1998
WO 9004645 A	03-05-1990	AT 121790 T CA 2001212 A DE 68922390 D DE 68922390 T EP 0394406 A JP 2993982 B JP 3502642 T US 5496697 A US 5278048 A	15-05-1995 21-04-1990 01-06-1995 05-10-1995 31-10-1990 27-12-1999 20-06-1991 05-03-1996 11-01-1994
EP 0608153 A	27-07-1994	FR 2700553 A AU 5835294 A WO 9417174 A	22-07-1994 15-08-1994 04-08-1994
US 5494044 A	27-02-1996	AU 5568490 A CA 2064193 A DE 69018629 D WO 9013261 A DK 471721 T EP 0471721 A HK 35696 A JP 5501965 T	29-11-1990 11-11-1990 18-05-1995 15-11-1990 26-06-1995 26-02-1992 08-03-1996 15-04-1993
EP 0818540 A	14-01-1998	JP 8322594 A JP 9065893 A US 5897993 A WO 9630542 A	10-12-1996 11-03-1997 27-04-1999 03-10-1996
US 4125436 A	14-11-1978	KEINE	

**This Page Blank (uspto)**

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**

**This Page Blank (uspto)**